

北関東高原山系におけるフモトミズナラの種特性と ミズナラおよびコナラの種特性との比較

著者	望月 寛子, 逢沢 峰昭, 中山 ちさ, 飯塚 和也, 大久保 達弘
著者別表示	Mochizuki Hiroko, Aizawa Mineaki, Nakayama Chisa, Iizuka Kazuya, Ohkubo Tatsuhiro
雑誌名	植物地理・分類研究
巻	61
号	1
ページ	31-43
発行年	2013-12-01
URL	http://doi.org/10.24517/00053551

望月寛子¹・逢沢峰昭²・中山ちさ¹・飯塚和也²・大久保達弘²：北関東高原山系におけるフモトミズナラの種特性とミズナラおよびコナラの種特性との比較

¹〒 321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350 宇都宮大学大学院農学研究科, ²〒 321-8505 栃木県宇都宮市峰町 350 宇都宮大学農学部

Hiroko Mochizuki¹, Mineaki Aizawa², Chisa Nakayama¹, Kazuya Iizuka² and Tatsuhiro Ohkubo² : Comparison of species characteristics of *Quercus serrata* subsp. *mongolicoides* with those of *Q. mongolica* var. *grosseserrata* and *Q. serrata* in Mt. Takahara, northern Kanto district.

¹Graduate School of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine-machi, Utsunomiya, Tochigi, 321-8505, Japan; ²Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine-machi, Utsunomiya, Tochigi, 321-8505, Japan

Abstract

We revised the taxonomic status of *Quercus serrata* subsp. *mongolicoides* (QSM) population occurring in hilly and lower mountainous regions of northern Kanto district. We conducted analysis of leaf morphology, genetic analysis and observation of leaf phenology for three congener species, QSM, *Q. serrata* (QS), and *Q. mongolica* var. *grosseserrata* (QMG). We set three sites, University forest at Funyu (S1), Kenminno-mori (S2) and Shojin-zawa (S3) in Mt. Takahara. Principal component analysis based on leaf morphological characters measured for the samples from the three sites showed that QSM and QMG apparently distinguished from QS. Genetic analysis including principal coordinates analysis, Bayesian clustering, and analysis of molecular variance using five loci of nuclear EST-SSR showed that QSM and QMG unambiguously distinguished from QS, but QSM and QMG were not discriminable from each other. Our observation of leaf phenology from the end of March to the middle of May in three years (2010-2012) in S1 and S2 indicated that QSM and QMG exhibited a similar pattern of the phenology and that their phenology progressed earlier than that observed in QS. Thus, we concluded that the QSM population in northern Kanto district should not be regarded as an intraspecific taxon of QS, but as intraspecific taxon of *Q. mongolica*, or intraspecific variation of QMG.

Key words: genetic analysis, leaf morphology, leaf phenology, nuclear EST-SSR

はじめに

東海地方、関東北部および北海道には、大陸のモンゴリナラ *Quercus mongolica* Fish. ex Ledeb. var. *mongolica* と葉の形態が酷似するナラが分布しており、“モンゴリナラ”として扱われてきた(井波1966; 佐鳥他1981; 宮部・工藤1986; 青山1992; 栃木県自然環境調査研究会植物部会編2003)。しかし、近年、東海地方・北関東の低山にみられる“モンゴリナラ”は、Ohba (2006)により、フモトミズナラ *Q. serrata* Thunb. ex Murray subsp. *mongolicoides* H. Ohba と命名さ

れ、Kanno et al. (2004)で示された遺伝的類縁性に基づいて、コナラ *Q. serrata* Thunb. ex Murray の亜種と位置づけられた。しかし、Kanno et al. (2004)には“モンゴリナラ”に関する記述はみられない。また、これに関連する菅野 (2006)では遺伝解析に“モンゴリナラ”3集団が用いられ、2集団がミズナラ *Q. mongolica* var. *grosseserrata* (Blume) Rehder et E.H.Wilson のクレードに、1集団がコナラ集団のクレードに含まれた結果が示されているものの、コナラにより近縁であるという根拠に乏しく、その分類学的位置づけは疑問視されて

いる（芹沢2008；須田・星野2008）。一方、フモトミズナラは外見的にコナラよりミズナラと類似していることから、コナラの亜種ではなくミズナラの変種とする見解（芹沢2008）もある。このように、フモトミズナラのカテゴリー的位置付けは未だ不明確といえる。

フモトミズナラのカテゴリー的位置づけを行う第一歩として、フモトミズナラ、ミズナラおよびコナラの種特性の比較が必要である。植物種のカテゴリーについては、葉緑体DNAがしばしば用いられているが、日本のナラ類は種間でハプロタイプを共有しており（Kanno et al. 2004；Okaura et al. 2007）、葉緑体レベルでの種識別は不可能とされてきた。このようなハプロタイプの共有は、祖先多型性（ancestral polymorphism）あるいは遺伝子浸透（introgression）に由来するものと考えられている（Whittemore and Schaal 1991；Petit et al. 1997；Matsumoto et al. 2009）。また、葉緑体DNAのほかに、AFLP（Amplified fragment length polymorphism）（Matsumoto et al. 2009）やRAPD（Random amplified polymorphic DNA）（李他2008）マーカーを用いてナラ類の種識別が試みられているが、実験条件の設定やデータの安定性など難点が多かった。しかし、近年、核DNAのEST（Expressed sequence tag）-SSRマーカーを用いることによって、PCR増幅と電気泳動のみという、より簡便な実験手法で日本のナラ類を対立遺伝子の頻度分布の違いにより、種レベルで識別できる可能性が示された（Ueno et al. 2008）。したがって、このマーカーを使用することにより、フモトミズナラ、ミズナラおよびコナラの遺伝的関係性を明らかにすることが可能となるかもしれない。また、形態的解析では、北関東山地においてフモトミズナラとミズナラの葉および堅果の形態比較がなされている（須田・星野2008）が、フモトミズナラとコナラとの形態比較は行われていない。したがって、これら3種の形態比較が必要と考えられる。

また、同所に生育する同一樹種はほぼ同じフェノロジーパターンを示すと予想される。したがって、コナラとフモトミズナラが形態的・遺伝的に明確に区別でき、かつ開葉フェノロジーパターンに差異が見られた場合は、両亜種が異なる種である可能性がある。

本研究では、葉形態解析、遺伝解析、開葉フェノロジーの3点から、北関東の高原山系に生育するフモトミズナラの種特性を把握し、ミズナラおよびコナラの種特性との比較を行い、フモトミズナラのカテゴリー的位置付けについて考察することを目的とした。

材料と方法

1. 調査地

調査は北関東の栃木県北部に位置する栃木県の高原山系で行った（Fig. 1）。高原山系は、那須火山帯に属する第四紀の成層火山であり、立室花崗岩類、天頂石斑岩、中新生塩谷層群、丸山流紋岩、寺山石英粗面岩および宮川流紋岩などの基盤岩の上に、火山体を構成する熔岩類と火砕物が累積し、さらに、これを覆って砂礫層および関東ローム層が広く分布している（鈴木1955）。気候は冬期に乾燥する太平洋型気候である。

栃木県内においては、フモトミズナラ（“モンゴリナラ”）とミズナラの分布境界はおおよそ500～600mにみられる（栃木県自然環境調査研究会植物部会編2003）。高原山系のこの標高域を踏査し、葉形態および落下堅果の形態の概査に基づいて、フモトミズナラ、ミズナラおよびコナラの分布域を把握した。そして、これに基づいて、同山系内に次の3つの調査地を設定した。1つ目の調査地は、フモトミズナラとコナラが同所的に生育している、塩谷郡塩谷町船生の宇都宮大学農学部附属船生演習林（北緯36°40′～36°49′、東経139°47′～139°51′、標高260～597m）（以下、船生）である（Fig. 1のS1）。ここでは、両種は、アカマツ *Pinus densiflora* Siebold et Zucc., クリ *Castanea crenata* Siebold et Zucc., エゴノキ *Styrax japonica* Siebold et Zucc., アカシデ *Carpinus laxiflora* (Siebold et Zucc.) Blume およびヤマツツジ *Rhododendron kaempferi* Planch. var. *kaempferi* などの主要樹種とともに天然生林内に生育している。船生演習林で観測された2004年を除く1995年から2006年の11年間の年平均気温は12.4℃、暖かさの指数（WI）は98.9℃、平均年降水量は1555.2mmである。

2つ目の調査地は、ミズナラとコナラが同所的に生育する矢板市長井にある栃木県民の森内の宮川溪谷沿い（緯度36°52′、東経139°50′、標高490～540m）（以下、県民の森）である（Fig. 1のS2）。ここでは両種は、宮川溪谷沿いに残された落葉広葉樹林の優占種となっている。気象庁塩谷観測所の1985～2011年の気温を基に、気温変化率0.6℃/100mを用いて算出した県民の森の年平均気温は9.4℃、WIは74.9℃である。塩谷観測所の1985～2011年の日別平均降水量は1,668mmである。

3つ目の調査地は、ミズナラのみ生育している塩谷郡塩谷町尚仁沢（北緯36°52′、東経139°49′、標高860～940m）（以下、尚仁沢）である（Fig. 1のS3）。ここでは、ミズナラは沢沿いの段丘状地形

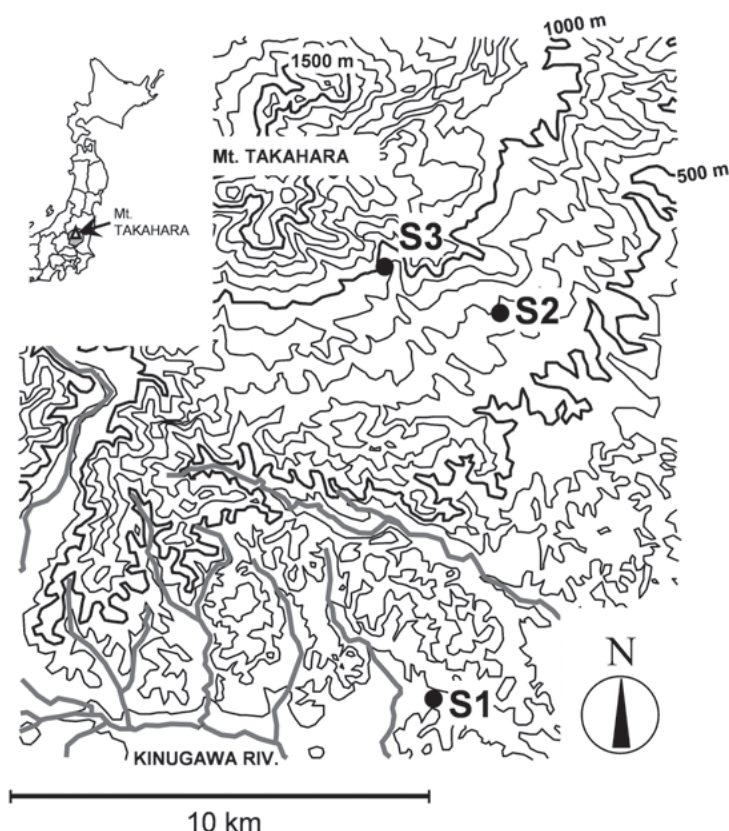


Fig.1. Locations of the study sites in Mt.Takahara, northern Tochigi.

S1, University forest at Funyu, Shioya-machi; S2, Kenminno-mori, Yaita-shi; S3, Shojin-zawa, Shioya-machi.

の緩傾斜地に優占林を形成している。上記同様に算出した尚仁沢の年平均気温は8.2℃、WIは65.4℃である。

なお、本調査地内およびその周囲ではカシワ *Quercus dentata* Thunb. はみられないことから、本調査地のフモトミズナラが北海道などでみられるようなミズナラとカシワの天然生雑種 (Ishida et al. 2003; Matsumoto et al. 2009) である可能性はない。

2. 葉形態解析

葉形態解析用の試料は、船生および県民の森においては、後述の開葉フェノロジー調査対象木のうち採取可能であったものから採取した。船生ではフモトミズナラ28個体およびコナラ23個体、県民の森においてはミズナラ16個体およびコナラ24個体を採取した。また、尚仁沢においてはミズナラ10個体から採取した。各個体において10m程度の高さにある陰葉15枚を採取した。採取した試料について、スケールを用いて葉身長 (BL)、葉柄長 (PL)、

最大葉身幅 (BW)、最大葉身幅までの距離 (DWP) を測定した (Fig. 2)。最大葉身幅 (BW) および最大葉身幅までの距離 (DWP) に関しては、主脈を中心に左右で測定を行い、最大葉身幅 (BW) は両側の合計値、最大葉身幅までの距離 (DWP) は両側の平均値を用いて解析を行った。また、葉裏面の星状毛数を評価するため、各個体からランダムに3枚ずつ葉を選び、直径6mmの円を開けた紙を葉にあて、円内の星状毛数をカウントし、「1：なし」、「2：1～10個」、「3：11～100個」、「4：101個以上」の4つの指数を用いて評価した。さらに、星状毛のカウントを行った個葉を対象に、鋸歯形の判定および側脈数のカウントを行った。鋸歯形は、島田他 (1993) および須田・星野 (2008) の鋸歯形判定基準を用いた (Fig. 2B)。ただし、コナラについては該当する基準がなかったことから、コナラに見られる先端が細い鋸歯形を鋸歯形階級1 (Fig. 2B) として追加し、判定を行った。側脈数は、主脈を中心に左右それぞれで明瞭なものをカウントした。そして、左右のうち多い方の側脈数をその葉の代表値

とした。そして、星状毛指数と鋸歯形は各個体の中央値を、その他の計測項目は各個体の平均値を求めた。そして、各調査地において、この各個体の値を種ごとにまとめて中央値（星状毛指数と鋸歯形）あるいは平均値とした。中央値はノンパラメトリック法のクラスカルウォリス検定とSteel-Dwass検定によって比較した。平均値はANOVAおよびTukey-Kramer's HSD検定によって比較した。さらに、菅(2001)に従い、すべての計測項目を用いて相関行列に基づく主成分分析を行った。

3. 遺伝解析

DNA抽出

遺伝解析用試料として、葉形態解析を行った個体の生葉を使用した。生葉はDNA抽出まで-20℃で冷凍保存した。生葉50mgからDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社)を用いて、全DNAを抽出した。抽出プロトコルは上記キットのマニュアルに従った。抽出したDNAは濃度測定後、TE緩衝液を用いて希釈し、鋳型DNAを調製した。

EST-SSR解析

解析には、Ueno et al. (2008) によりミズナラで開発された5対のEST-SSRマーカーを用いた (Table 2)。試薬調製およびPolymerase chain

reaction (以下、PCR) の反応条件はUeno et al. (2008) を基にした。PCR反応液は全量が10μlとなるように試薬を調製した。内訳は20ng鋳型DNA、1×PCRバッファー、200μMの各dNTP、1.5mM MgCl₂、0.2μMのForwardおよびReverseの各プライマー、0.5U Ampli Taq Gold (Applied Biosystems) である。なお、各プライマー対のうちForwardプライマーを蛍光色素 (NEDまたはPET) で標識した。

PCR増幅は以下の条件で行った。まず、予熱を94℃で10分間行った。その後、1サイクルにつき熱変性を94℃で45秒、アニーリングを55℃で45秒、伸長を72℃で45秒とし、これを35サイクル行った。サイクル終了後の後伸長は72℃で7分とした。PCR増幅にはGeneAmp PCR system 9700および2720 (Applied Biosystems) を用いた。得られたPCR産物を2%アガロースゲルで泳動し、PCR増幅を確認後、DNAオートシーケンサー GeneScan ABI3500 (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。解析により得られたデータは、GeneMapper ver.4.1 (Applied Biosystems) を用いて増幅断片のサイズから、各サンプルの対立遺伝子を決定した。

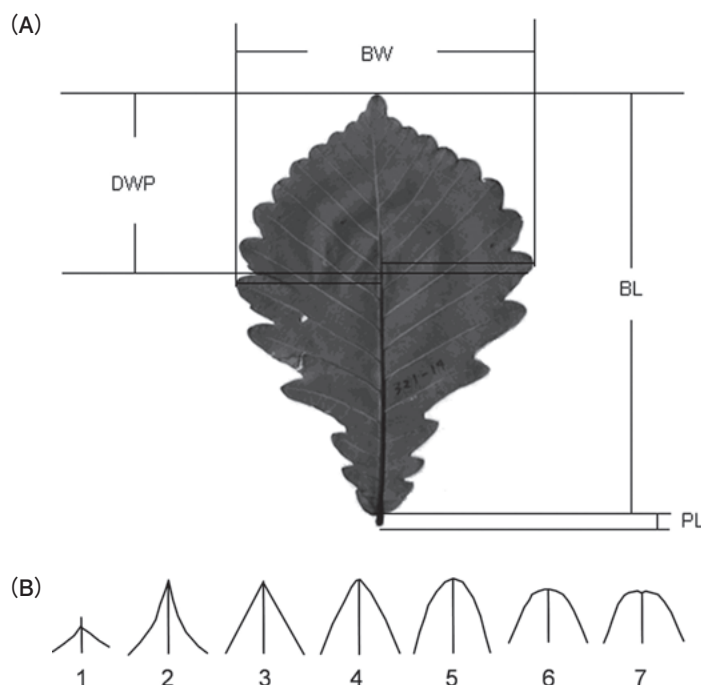


Fig.2. Measures of leaf characters (A) and index of serration of leaf (B) of the three *Quercus* species.

BL, blade length; BW, blade width; DWP, distance to the widest point from the top; PL, petiole length; an index of serration of leaf proposed by Suda and Hoshino(2008) was modified for use in this study.

Table 2. Characteristics of nuclear EST-SSR markers used in this study

Locus	Repeat motif	Ta(°C)	Allele size range	n _A	QSM		QMG			QS		
					H _O	H _E	n _A	H _O	H _E	n _A	H _O	H _E
QmC00419	(AG) ₃ (TC) ₇	55	171-178	5	0.435	0.558	4	0.130	0.329	4	0.383	0.363
QmC00716	(TC) ₁₅	55	243-274	14	0.913	0.902	12	0.870	0.871	11	0.511	0.481
QmC01368	(CCA) ₇	55	144-161	7	0.739	0.620	6	0.609	0.674	5	0.681	0.617
QmC01794	(GAA) ₉	55	88-108	7	0.565	0.761	7	0.478	0.761	2	0.085	0.081
QmC02052	(AG) ₁₀	55	242-264	6	0.739	0.739	9	0.652	0.778	8	0.745	0.777
mean				7.8	0.678	0.716	7.6	0.548	0.683	6.0	0.481	0.464

Ta, annealing temperature; n_A, number of alleles per locus detected; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity.

データ解析

データ解析には、5つの遺伝子座全てにおいて対立遺伝子を決定することができた93個体（フモトミズナラ23個体、ミズナラ23個体、コナラ47個体）を用いた。各マーカーの特性はCervus ver.3.0 (Kalinowski et al. 2007) を用いて算出した。また、GenAlEx ver.6.4 (Peakall and Smouse 2006) を用いて、各個体の遺伝子型を基に、各個体間の遺伝的距離 (Smouse and Peakall 1999) を算出した。そしてこの遺伝距離に基づいて、主座標分析 (Principal Coordinates Analysis) を行った。主座標分析は、GenAlExの初期設定に従い、個体間の遺伝距離行列を共分散行列に変換して分析を行い、各々の共分散値は、 $n-1$ の平方根で割り、標準化したものを用いた (Peakall and Smouse 2006)。

各種のもつ遺伝構造を、STRUCTURE ver. 2.1 (Pritchard et al. 2000) を用いて推定した。STRUCTURE解析は、各遺伝マーカーが連鎖していないことを仮定した上で、ベイズの統計理論を基にした確率モデルとMarkov Chain Monte Carlo (MCMC) アルゴリズムを基にして各集団の遺伝的構造を推定する方法である。この「集団」は、「種」によって置き換えて解析することが可能である。この解析を用いる利点は、すべての個体が事前にどの種に属しているかの情報を与えずに、 K 個の遺伝的なまとまり（1つの共通祖先種から分化したクラスター）に割り振ることにより、各種に属する個体がどのクラスターに由来しているのかを調べることができる点にある (Pritchard et al. 2000)。本研究では、各マーカー間の連鎖平衡についてFSTAT ver.2.9.3.2 (Goudet 2001) を用いて検定した上で、STRUCTURE解析を行った。解析の計算上の設定は、混合モデル (Admixture model) およびF model (Allele frequencies correlated), burn-in periodを 10^5 , MCMCのシミュレーションの繰

り返し数を 10^6 とした。また、 $K=1$ から6までの各 K について、5回の反復計算をした。最適クラスター数 K は、推定確率の自然対数値LnP(D)の最大値を指標とした方法 (Pritchard and Wen 2004), 並びにEvanno et al. (2005) の ΔK を指標とする方法によって評価した。

また、種間の遺伝的分化の程度を評価するため、GenAlEx ver.6.4を用いてAMOVA (analysis of molecular variance; Excoffier et al. 1992) を行った。AMOVAは、フモトミズナラとコナラ、ミズナラとコナラ、フモトミズナラとミズナラの3つの組み合わせで行い、核SSRマーカーによって推定された全体の遺伝的分散に対する種間の分散の有意性を検定した。

4. 開葉フェノロジー調査

2種が同所的に生育する船生（フモトミズナラ・コナラ）および県民の森（ミズナラ・コナラ）において、3月下旬から5月中旬にかけて開葉フェノロジーの調査を行った。フモトミズナラとミズナラが同所的に生育している場所が見つからなかったため、両種間のフェノロジーの比較はコナラを介して行った。船生においては、フモトミズナラ28個体、コナラ29個体、県民の森においては、ミズナラ21個体、コナラ31個体にタグを設置し、約1週間間隔でこれらの対象木を双眼鏡を用いて目視し、開葉段階を記録した。開葉段階は、冬芽が開き、葉が広がる段階を木村他 (1994) および生方 (2003) を参考に、シュートレベルと個体 (樹冠) レベルを同時に判定できる6段階の判定基準を設け、個体ごとに判定した (Table 1)。開葉フェノロジー調査は、2010年～2012年の3年間行った。0, 1, 2, 3の各開葉段階の間隔は、生方 (2003) にない、ほぼ等間隔になるように設定し、間隔尺度とみなした。そして、各個体の開葉度0, +, 1, 2, 2+, 3に対して、それぞれ0, 0.5, 1, 2, 2.5および3の数値を割り

Table.1. Leafing ranks used for the three *Quercus* species

Leafing ranks	
0	not yet buded
+	proportion of leaves with little extension occupying sparsely (less than 20%) of a tree crown
1	proportion of leaves ongoing extension, but shape of which not yet clear, reaching 20% of a tree crown
2	proportion of leaves ongoing extension, but shape of which not yet clear, reaching 50% of a tree crown
2+	proportion of leaves clearly extended reaching 50% of a tree crown
3	proportion of leaves clearly extended reaching almost 100% of a tree crown

Leafing ranks proposed by Kimura et al. (1994) were modified for use in this study.

当てて調査日ごとの各種の平均開葉度を算出した。

結果

1. 葉形態解析

船生、県民の森および尚仁沢の葉の形質項目別の樹種別平均値を Fig.3 に示した。個々の形質の平均値についてみると、フモトミズナラは、葉身長 16.4cm, 葉身幅 10.4 cm, 最大葉身幅までの距離 6.8cm, および葉身長に対する葉身幅の比は 0.63 と、ミズナラおよびコナラと比べて概ねいずれの項目も有意に高い値を示した ($P<0.05$)。フモトミズナラの葉身長に対する最大葉身幅までの距離の比は 0.42 と、ミズナラの 0.45 およびコナラ 0.45 ~ 0.46 よりも有意に低い値を示した ($P<0.05$)。すなわち、船生のフモトミズナラの葉は、大きく、幅が広く、最大幅の位置が葉の先端寄りにあった。また、葉柄長は、フモトミズナラが 0.5cm, ミズナラが 0.4 ~ 0.5cm と、コナラの 1.2 ~ 1.3cm よりも有意に短かった ($P<0.05$)。側脈数においては、フモトミズナラは 15.2, ミズナラで 15.7 ~ 18.2 と両種間で明確な違いは見られなかったが、コナラの 13.1 ~ 13.5 より有意に多かった ($P<0.05$)。葉身長に対する側脈数の比は、フモトミズナラで 0.96 と、ミズナラとコナラよりも有意に低く ($P<0.05$)、葉のサイズが大きいにも関わらず側脈数は少なかった。星状毛に関しては、フモトミズナラの中央値は 0.0 と稀に確認できる程度であったのに対し、コナラは 3.0 と密生していた。また、ミズナラは 1.5 とフモトミズナラとコナラの中間の値を示した。鋸歯形の中央値は、フモトミズナラは 4.8 と、県民の森のミズナラ (3.8), 尚仁沢のミズナラ (3.0), 船生と県民の森のコナラ (1.0) よりも有意に高く ($P<0.05$)、特にコナラとの違いは明瞭であった。

さらに、以上の測定項目の値を用いて主成分分析を行い、第 1 主成分 (寄与率 65.68 %) と第 2 主成分 (寄与率 13.00 %) の 2 軸上に展開した結果、フ

モトミズナラはミズナラとの類似性を示し、コナラとは明確に区分された (Fig. 4)。第 1 象限・第 2 象限にほぼフモトミズナラおよびミズナラがまとまったが、フモトミズナラは主に第 1 象限に集約する傾向がみられた (Fig. 4)。また、調査地の標高の違いに対応して、県民の森のミズナラは、船生のフモトミズナラと尚仁沢のミズナラの中間にまとまる傾向がみられた。

2. 遺伝解析

遺伝解析を行った 93 個体において検出された 5 つの SSR マーカーの特徴を Table 2 に示した。5 つの遺伝子座において検出された種ごとの平均対立遺伝子数 (n_A) は 6.0 ~ 7.8 であり、種ごとの平均ヘテロ接合度の期待値 (H_E) は 0.464 ~ 0.716 と、高い多型性を得ることができた。主座標分析の結果、フモトミズナラはミズナラと同じグループに含まれ、コナラとは明確に大別された (Fig. 5)。また、コナラおよびミズナラにおいて調査地ごとのまとまりはみられなかった。

各マーカー間には有意な連鎖不平衡はみられなかった ($P>0.05$) ことから、STRUCTURE 解析を行った。その結果、最適クラスター数は $K=2$ となった。フモトミズナラとミズナラはクラスター I で、コナラはクラスター II で占められ、フモトミズナラはコナラと遺伝的に明確に区別された (Fig. 6)。また、AMOVA の結果、フモトミズナラとミズナラの間で有意な遺伝的分化はみられずほぼゼロとみなされた ($\Phi_{PT}=0.018$, $P>0.05$)。これに対して、フモトミズナラとコナラ ($\Phi_{PT}=0.441$, $P=0.010$)、ミズナラとコナラ ($\Phi_{PT}=0.481$, $P=0.010$) でそれぞれ有意な遺伝的分化がみられた (Table 3)。

3. 開葉フェノロジー

船生および県民の森における、ミズナラ・フモトミズナラ・コナラの平均開葉度を Fig. 7 に示した。

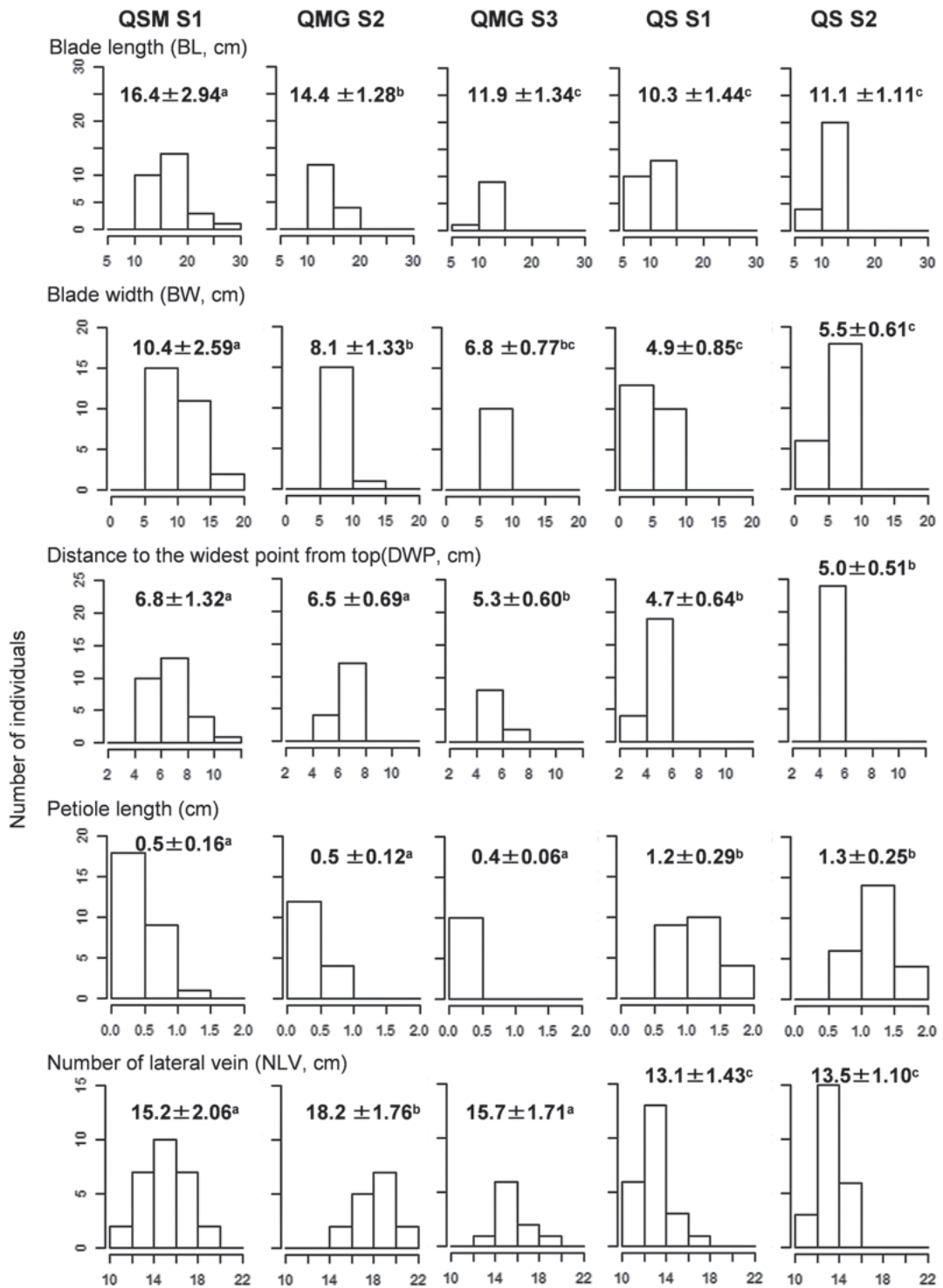
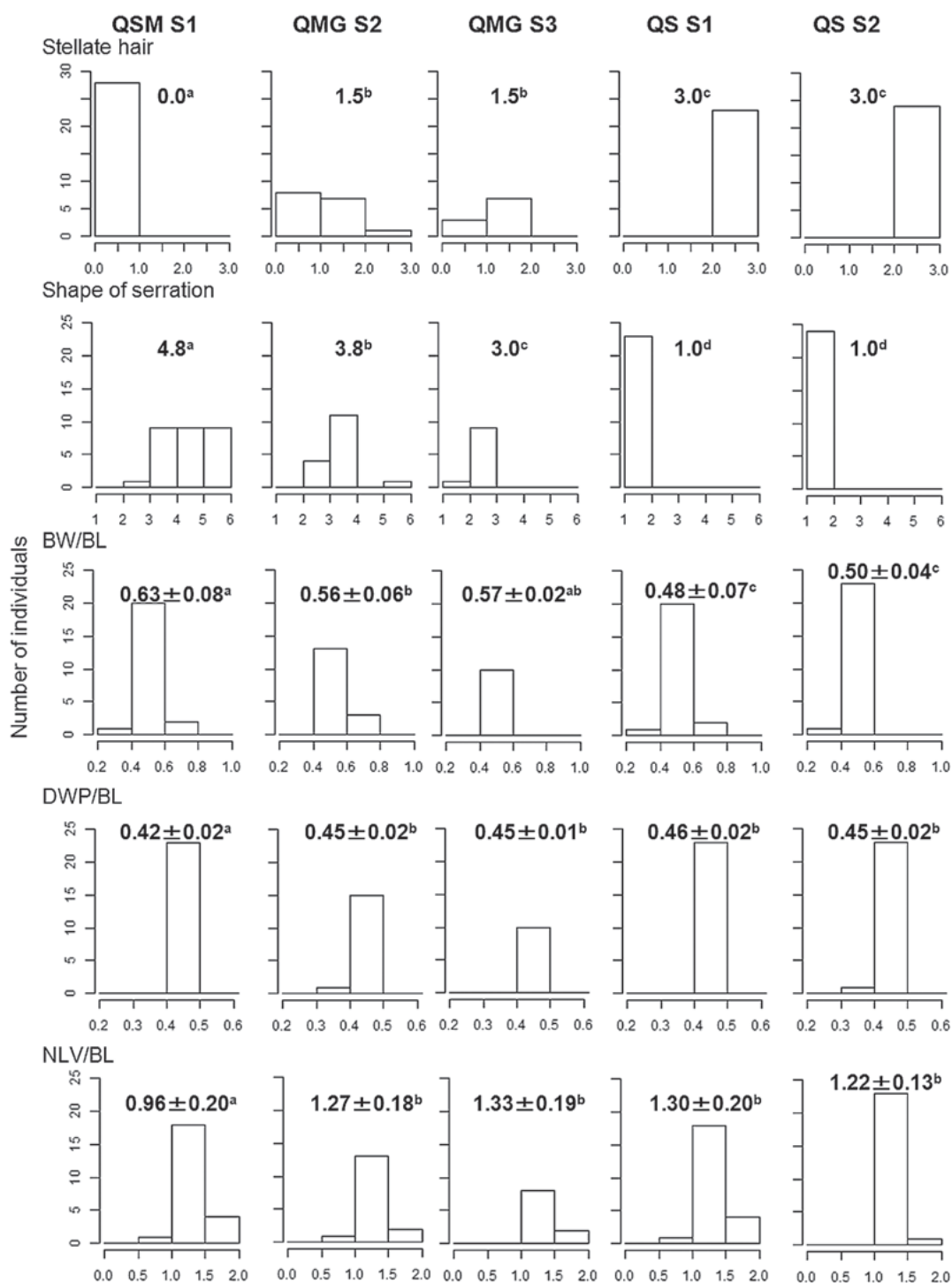


Fig.3. Frequency distribution of each leaf characteristics measured in the three *Quercus* species.

Mean ± standard deviation is shown except for medians in stellate hair and shape of serration. Different alphabets indicate significant difference ($P < 0.05$) among them using ANOVA and Tukey-Kramer's HSD test; in stellate hair and shape of serration, non-parametric Kruskal-Wallis test and subsequent post-hoc Steel-Dwass test were carried out.



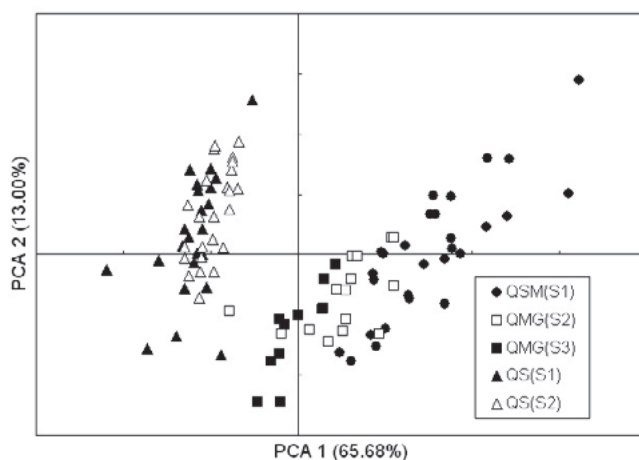


Fig.4. Principal component analysis based on leaf morphological measures obtained in the three *Quercus* species in each study site (S1-S3).

QMG, *Q. mongolica* var. *grosseserrata*; QSM, *Q. serrata* subsp. *mongolicoides*; QS, *Q. serrata*.

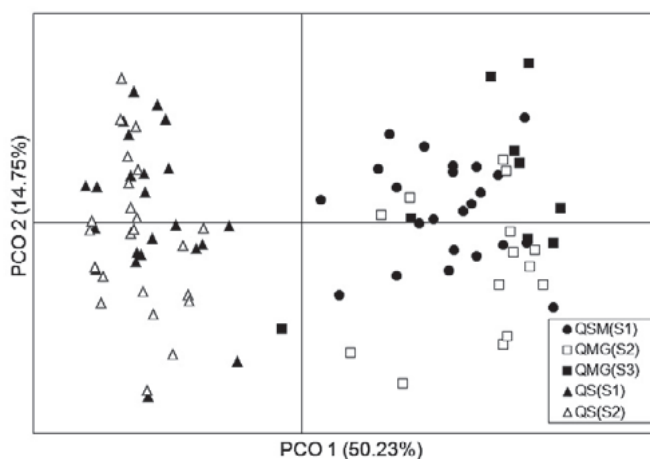


Fig.5. Principal coordinates analysis based on genetic distance using allele composition obtained from five nuclear EST-SSR loci.

QMG, *Q. mongolica* var. *grosseserrata*; QSM, *Q. serrata* subsp. *mongolicoides*; QS, *Q. serrata*.

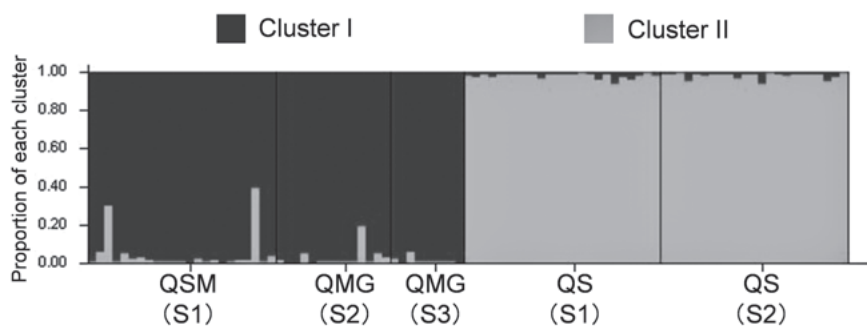


Fig.6. Results of Bayesian clustering STRUCTURE analysis for two clusters obtained from five nuclear EST-SSR loci.

Each individual is represented by a thin vertical line. QMG, *Q. mongolica* var. *grosseserrata*; QSM, *Q. serrata* subsp. *mongolicoides*; QS, *Q. serrata*.

Table.3. Results of AMOVA (analysis of molecular variance) for the three *Quercus* species

Species pair	Percentage of variation		Φ_{PT}	P-value
	Among species	Within species		
QSM vs QS	44	56	0.441	0.01
QMG vs QS	48	52	0.481	0.01
QSM vs QMG	2	98	0.018	>0.05

QMG, *Q. mongolica* var. *grosseserrata*; QSM, *Q. serrata* subsp. *mongolicoides*; QS, *Q. serrata*; df, degree of freedom; Φ_{PT} , a statistics analogous to F_{ST} , is the estimate of genetic differentiation between species provided by GenAlEx.

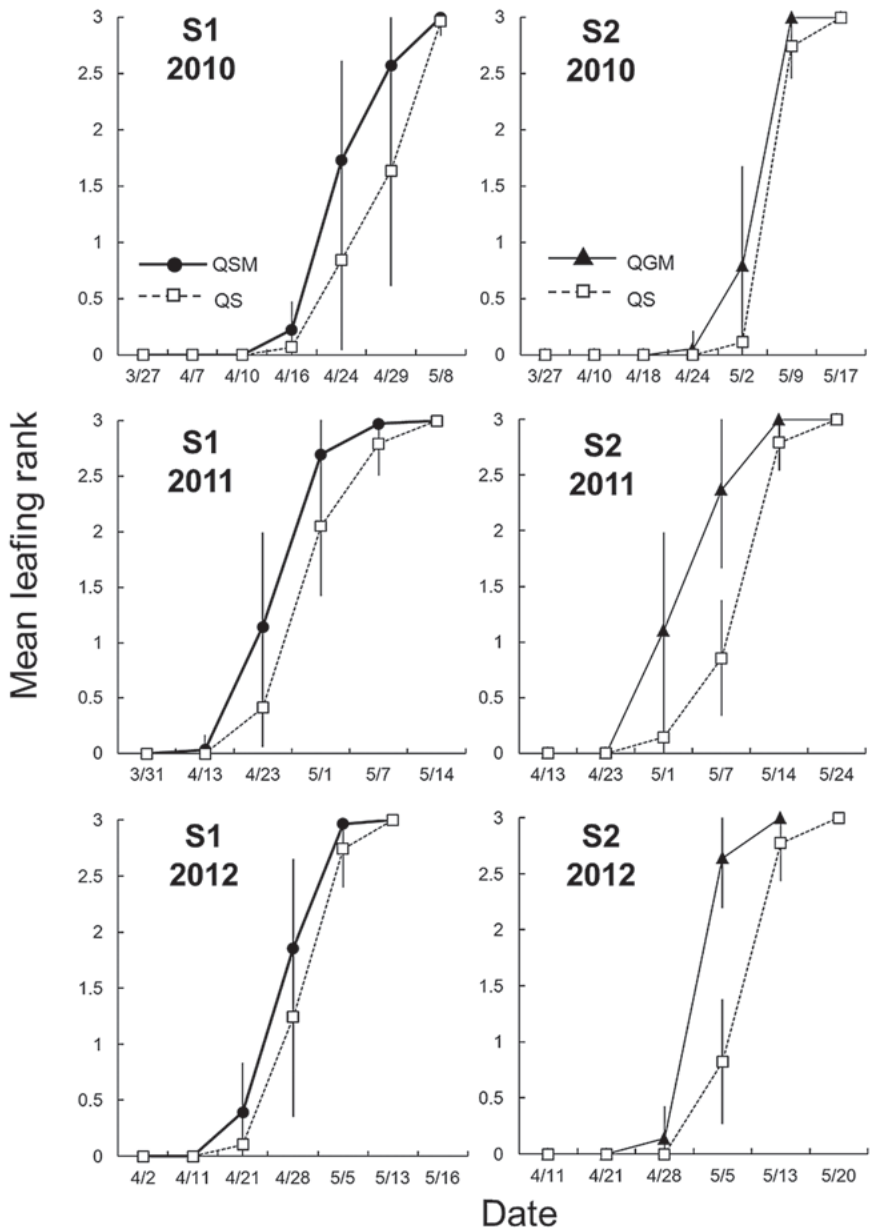


Fig.7. Patterns of leaf phenology observed in the three *Quercus* species from the end of March to the middle of May in each study site (S1 and S2). Mean \pm standard deviation (bar) of leafing rank for each species is shown.

船生および県民の森においてもフモトミズナラとミズナラは4月中旬から下旬にかけて開葉が始まり、5月初旬にはほとんどの新葉の形がはっきりするほど展開していた。それに対し、コナラはフモトミズナラ・ミズナラと同じく4月中旬から下旬にかけて開葉が始まるが、開葉の進展がやや遅く、全個体の葉が完全に展開するのは5月中旬であった。

考察

1. フモトミズナラとコナラの比較

本研究の主成分分析による葉形態、および主座標分析、STRUCTURE解析およびAMOVAによる遺伝解析の結果から、フモトミズナラはコナラと形態的、遺伝的に大きく異なることが明らかになった。また、ナラ類のフェノロジーは個体間、産地間で変異が大きく（門松1998）、年変動も大きいとされる（木村他1994）が、本研究における3年間の開葉フェノロジー調査の結果、同所的に生育していながらいずれの年においてもフモトミズナラはコナラよりも開葉時期が早い傾向を示し（Fig. 7）、形態・遺伝的な差異と明瞭に対応したものであった。これらの結果を総合すると、少なくとも北関東のフモトミズナラはコナラとは種が異なり、コナラの亜種とみなすことはできないと考えられる。

2. フモトミズナラとミズナラの比較

主座標分析、STRUCTURE解析およびAMOVAのいずれの遺伝解析においても、フモトミズナラとミズナラ間に遺伝的差異はみられなかった。中国北東部から北部にかけて広く分布するモンゴリナラと、遼東半島から中国北西部にかけて分布し、一部の地域ではモンゴリナラと分布域が重なるリョウトウナラ *Quercus liaotungensis* Koidz. は、表現型の可塑性や潜在的な雑種に由来すると考えられる中間型の存在から同種あるいは別種とする見解があり、分類学的位置付けが不明確な種群であった（Zeng et al. 2010）。しかし、近年核SSRマーカーを用いた解析がなされ、両種は遺伝的に明確に区別される種であることが明らかにされた（Zeng et al. 2010）。モンゴリナラとリョウトウナラ間の遺伝的分化の程度を示す θ （Weir and Cockerham 1984）は0.049～0.069であった。使用したマーカーの多型性、解析遺伝子座数、解析集団数が本研究と異なるものの、この値と比較すると、本研究でみられたフモトミズナラとミズナラの遺伝的分化の程度は $\Phi_{PT}=0.018$ （ Φ_{PT} は θ に相当するパラメーター）であり、この値は有意ではなかった。また、フモトミズナラとミズナラの開葉フェノロジーについてコナラを介して比較すると、両種はコナラよりも開

時期が早いという点で開葉パターンが類似していた。県民の森のミズナラは船生のフモトミズナラよりも、開葉はおよそ1週間遅かったが、コナラも船生より県民の森でおよそ1週間開葉に遅れがみられたことを考慮すると、ミズナラとフモトミズナラの開葉フェノロジーパターンの類似性は高いものと考えられる。

しかし、個々の葉の形態についてみると、フモトミズナラは、葉柄長の長さがミズナラと共通して短い点以外は、葉が大きいこと、葉の最大幅の位置が先端寄りであること、星状毛がほとんど確認できないこと、葉身長に対して鋸歯数が少ないこと、鋸歯の先端が丸みを帯びることなど、ミズナラと違いが見られた（Fig. 3）。両者の葉形態の比較を行った須田・星野（2008）においても、フモトミズナラはミズナラに比べて、葉が大きく、葉長に対して幅が広く、側脈が少ないことを指摘しており、本研究と共通する部分がある。また、両者は、堅果の形態についても明確に異なり、フモトミズナラの堅果は、ミズナラに比べると高さが低く、直径はわずかに大きく、縦に伸長しない丸い形態をしている〔飯塚他2008（船生のフモトミズナラを低山性のミズナラとして扱う）；須田・星野2008〕。このように、両種間には形態上の違いが認められる。これらのことを考慮すると、少なくとも北関東のフモトミズナラはミズナラと同じ *Q. mongolica* の種内分類群、さもなくばミズナラのエコタイプ（ecotype）といった種内変異であると考えられる。能城（1984）はミヤマナラ *Q. mongolica* var. *undulatifolia* Kitam. et T.Horik. とミズナラの葉形態と標高との対応関係を調べ、葉形態が標高傾度に対応したクラインをなさず、不連続性をもつことを明らかにし、ミヤマナラはミズナラの変種とすることの妥当性を示した。本研究における葉形態解析によって、星状毛がフモトミズナラでほとんどみられないのに対して、それより高標高域に生育するミズナラにはみられるといった、標高傾度に沿った星状毛数の不連続性が示唆された。したがって、フモトミズナラとミズナラの分類学的関係を明らかにするためには、様々な標高域に生育するフモトミズナラとミズナラの形態を調べ、標高傾度に沿った形態的分化を明らかにすることが重要であると考えられる。

謝辞

本研究を行うに当たり、栃木県県民の森事務所、林野庁塩那森林管理署、宇都宮大学農学部附属船生演習林より、調査許可を頂いた。森林総合研究所森林遺伝研究領域の松本麻子博士並びに上野真義博士より、本研究で使用したプライマーの提供と、本研

究を進める上でのご助言をいただいた。2名の査読者の方より、本原稿に対するたいへん有益なコメントをいただいた。宇都宮大学農学部森林科学科森林生態学・育林学研究室の皆様には、調査・サンプリングに際してお手伝いをいただいた。以上の方々に心より御礼申し上げます。

引用文献

- 青山俊吉. 1992. モンゴリナラとイカリソウの白花品の分布について. フロラ栃木 **1**: 24-36.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* **14**: 2611-2620.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479-491.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- 飯塚和也・榮澤純二・宮本尚子・石栗太・横田信三・吉澤伸夫. 2008. 栃木県の低山地域に天然分布しているミズナラの堅果、苗および葉の形態的特徴、並びに形態異常苗の出現. 宇都宮大学農学部演習林報告 **44**: 9-14.
- 井波一雄. 1966. 岐阜県の植物分類地理概説 岐阜県の植物. 大衆書房, 岐阜.
- Ishida, T.A., Hattori, K., Sato, H. and Kimura, M.T. 2003. Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): insight from morphological traits, amplified fragment length polymorphism markers, and leafminer composition. *Amer. J. Bot.* **90**: 769-776.
- 門松昌彦. 1998. ナラ類における開葉時期と紅葉時期との関係. 北海道大学農学部演習林研究報告 **55**: 31-39.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. and Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**: 1099-1106.
- 菅 民郎. 2001. Excelで学ぶ多変量解析入門. オーム社, 東京.
- 菅野宗武. 2006. 日本産コナラ属コナラ節植物(ブナ科)の系統地理学および集団遺伝学的研究. 分類 **6**: 65-70.
- Kanno, M., Yokoyama, J., Suyama, Y., Ohyama, M., Itoh, T. and Suzuki, M. 2004. Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. *J. Plant Res.* **117**: 311-317.
- 木村徳志・木佐貫博光・倉橋昭夫・佐々木忠兵衛. 1994. ミズナラのフェノロジー—東京大学北海道演習林における35年間の経年変動—. 第105回日本林学会大会論文集: 455-458.
- Matsumoto, A., Kawahara, T., Kanazashi, A., Yoshimaru, H., Takahashi, M. and Tsumura, Y. 2009. Differentiation of three closely related Japanese oak species and detection of interspecific hybrids using AFLP markers. *Botany* **87**: 145-153.
- 宮部金吾・工藤祐舜. 1986. 北海道主要樹木図譜. 北海道大学図書刊行会.
- 能城修一. 1984. 巻機山におけるミヤマナラとミズナラの変異. 植物地理・分類研究 **32**: 116-126.
- Ohba, H. 2006. Fagaceae. In: Flora of Japan. K. Iwatsuki et al., (eds) Kodansha, Tokyo, 42-60.
- Okaura, T., Quang, N.D., Ubukata, M. and Harada, K. 2007. Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes Genet. Syst.* **82**: 465-477.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**: 288-295.
- Petit, R.J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducousso, A. and Kremer, A. 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9996-10001.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945-959.
- Pritchard, J.K. and Wen, W. 2004. Documentation for structure software, ver. 2. Department of Human Genetics, The University of Chicago. Available at: <http://ritch.bsd.uchicago.edu>.
- 李 承珉・加藤定信・吉野 毅・中尾哲也. 2008.

- コナラとミズナラにおける種識別を目的にした RAPD マーカーの DNA 解析. 森林バイオマス利用学会誌 **3**: 43-48.
- 佐島英雄・須藤志成幸・津久井芳雄. 1981. 桐生市植物誌. 桐生教育委員会, 桐生.
- 芹沢俊介. 2008. 東海地方丘陵地の「モンゴリナラ」. シデコブシ **1** (1): 54-55
- 島田健一・井出雄二・門松昌彦・鈴木和夫. 1993. ミズナラ, カシワ及びその雑種と, モンゴリナラの遺伝変異 (I) —葉形と葉身裏の星状毛の変異について—. 第104回日本林学会大会論文集: 485-486.
- 須田大樹・星野義延. 2008. 北関東におけるフモトミズナラの葉・堅果・殻斗の形態について. 埼玉県立自然の博物館研究報告 **2**: 19-26
- Smouse, P.E. and Peakall, R. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. Heredity **82**: 561-536.
- 鈴木陽雄. 1955. 栃木県北部新生界の地史学的研究3, 高原山東南斜面栃木県有林付近の地質. 研究論集 第2部 (宇都宮大学学藝学部) **4**: 23-32.
- 栃木県自然環境調査研究会編. 2003. 栃木県自然環境基礎調査とちぎの植物 I. 栃木県林務部自然環境課栃木.
- 生方正俊. 2003. 北海道におけるミズナラの遺伝子資源保存および天然林施業に関する生態遺伝学的研究. 林木育種センター研究報告 **19**: 25-120.
- Ueno, S., Taguchi, Y. and Tsumura, Y. 2008. Microsatellite marks derived from *Quercus mongolica* var. *crispula* (Fagaceae) inner bark expressed sequence tags. Genes Genet Syst. **83**: 179-187.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. Evolution **38**: 1358-1370.
- Whittemore, A.T. and Schaal, B.A. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 2540-2544.
- Zeng, Y.-F., Liao, W.-J., Petit, R.J. and Zhang, D.-Y. 2010. Exploring species limits in two closely related Chinese oaks. PLoS ONE **5**: 1-15.